Manual de Treinamento para TR DPP® - HIV-1/2 - SSP

Ensaio qualitativo para detecção de anticorpos específicos da infecção pelo HIV-1/2 em amostras de sangue total, soro,punção digital, plasma humano.

www.bio.fiocruz.br

Considerações Técnicas

1. Considerações Técnicas

Desde que a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) foi descrita pela primeira vez em 1983, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tornou-se uma epidemia global.

De acordo com o relatório anual do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS, ao final de 2007 existiam no mundo, aproximadamente, 33 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS. Cerca de 2,7 milhões de pessoas adquiriram o HIV durante o ano de 2007 e mais de 2 milhões de óbitos foram atribuídos a doenças relacionadas à AIDS.

O HIV é um vírus com genoma RNA, pertencente ao gênero retrovírus. Este gênero é caracterizado pela presença de uma enzima denominada transcriptase reversa que é responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia de DNA complementar (cDNA). No desenvolvimento do ciclo, o cDNA pode, então, se integrar ao genoma da célula hospedeira, geralmente as células do sistema fagocítico mononuclear (SMF).

O vírus do HIV é esférico, circundado por um envelope lipoprotéico. O RNA genômico contém 10.000 bases e é caracterizado pela presença de duas LTRs (Long Terminal Repeats) e nove regiões, três delas codificadoras de proteínas : gag, pol e env. As regiões do gag, pol e env codificam as proteínas e glicoproteínas p-24, p17, gp-120, gp41 e as enzimas transcriptase reversa, proteases e integrases.

Até hoje, foram descritos dois tipos de HIV, denominados HIV-1 e HIV-2. Também têm sido descritas variantes genômicas (subtipos) para os isolados do HIV-1, o que confere a classificação dos vírus em dois grupos principais: M (major) e O (outlier), com variabilidade genética de até 30% entre eles. No grupo M identificam-se nove subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H, e I) e no grupo O apenas um. Em relação ao HIV-2 descrevem-se cinco subtipos (A, B, C, D, e E).

A homologia genética observada nos genomas provirais do HIV-1 e HIV-2, é de aproximadamente 40-45%, o que determina a codificação e síntese de diversos produtos gênicos semelhantes. Este fato justifica certa taxa de sororreatividade cruzada entre ambos, observada nos testes sorológicos diagnósticos.

No indivíduo infectado, o vírus causa uma redução da subpopulação de células T, chamadas de células T *helper* que torna esses pacientes suscetíveis a infecções oportunistas e certas malignidades. As principais vias de transmissão são: relação sexual desprotegida, contaminação por sangue ou hemoderivados e a transmissão de mãe para filho durante o parto.

O envelope do HIV é o principal alvo da resposta imune. A presença do vírus faz com que o sistema imune dos pacientes produza anticorpos anti-HIV. A detecção destes anticorpos pode ser usada como um instrumento de diagnóstico.

Ensaios imunoenzimáticos, testes rápidos, imunofluorescência, Western Blot, técnicas de PCR e diversos outros métodos estão disponíveis para a detecção do HIV-1 e HIV-2.

O TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos - SSP é um teste rápido de uso único, visando a detecção de anticorpos específicos da infecção pelo HIV tipos 1 e 2 (HIV-1, grupo M e O e HIV-2 subtipo A, B,C, D e E),em amostras de sangue total venoso, punção digital, soro ou plasma humano.

Seu uso é adequado em algoritmos utilizando testes rápidos para definição do diagnóstico da infecção pelo HIV, conforme portaria 151 de 14 de outubro de 2009. Resultados reativos são evidências de exposição ao HIV-1 ou HIV-2 (não os diferenciando) e podem ser usados como suporte ao diagnóstico.

O TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos emprega, como reagente de captura, uma combinação de antígenos virais HIV-1 e HIV-2 fixados a uma membrana de nitrocelulose (suporte sólido), anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal. O teste se baseia na tecnologia de imunocromatografia e utiliza plataforma de duplo percurso.

Para a execução do ensaio a amostra a ser testada é aplicada ao poço 1 no suporte e, logo em seguida, é adicionado tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo e permite que os anticorpos anti-HIV-1 e/ou anti-HIV-2, presentes na amostra, liguem-se aos antígenos formando um complexo. Na etapa seguinte à migração da amostra, adiciona-se o tampão de corrida ao poço 2. O conjugado se liga aos anticorpos específicos produzindo uma ou mais linhas na área teste (T) determinando o surgimento de uma linha colorida rosa ou roxo.

Na ausência de anticorpo anti-HIV-1 e/ou anti-HIV-2 não há o aparecimento da linha teste, sendo assim uma reação não regente.

A eficiência do ensaio é controlada para garantir a segurança do teste. Um reagente controle imobilizado na membrana do suporte determinará o surgimento de uma linha, cuja presença demonstrará que os reagentes estão funcionando corretamente (área controle C).

O TR DPP® HIV-1/2 apresenta diversas vantagens. O resultado é liberado em menos de 30 minutos e sua execução não depende da utilização de equipamentos sofisticados. Isto é importante, pois pode tornar o teste executável nos mais diversos ambientes laboratoriais.

2. Apresentação e componentes do ensaio

Material Fornecido:

TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos – SSP
(para 10 ou 20 determinações):

- Suportes DPP® HIV com antígenos de HIV-1/2 embalados individualmente
    - 10 ou 20 unidades

-Tampão de corrida – 01 frasco com 3 mL ou 6 mL

- Alças coletoras descartáveis (10µL) 10 ou 20 unidades
- Frasco para eluição - 10 ou 20 frascos com 1 mL cada
- Lancetas estéreis descartáveis -10 ou 20 unidades
- Curativo Adesivo Estéril 10 ou 20 unidades
- Manual de Instruções de Uso

Material Complementar não fornecido:

- Cronômetro ou relógio
- Luvas descartáveis e jaleco para proteção individual
- Algodão
- Álcool 70%
- Água sanitária ou solução de hipoclorito de sódio a 2,5%
- Recipiente para descarte de material biológico e perfuro-cortante

Figura 1 – TR DPP®HIV 1/2 - SSP

IMPORTANTE

Recomenda-se utilizar o kit somente até a data de validade do kit, que é considerada aquela descrita na embalagem.
Não usar os insumos de lotes de kits diferentes.
Recomenda-se estocagem do kit de 2º a 30º C.

3. Procedimento para realização do TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos - SSP

- Certifique-se de que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente (15 a 25ºC) antes de ser utilizada.
- Retirar o número necessário de componentes do kit TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos -SSP necessários à execução do ensaio e colocá-los sobre uma superfície plana. Certifique-se de que os componentes do kit estejam à temperatura ambiente no momento do uso.
- Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o número de registro do paciente ou número de identificação da amostra, além do número do lote do kit de onde o teste foi retirado.

IMPORTANTE

CRITÉRIO DE REJEIÇÃO DO ENSAIO

O teste TR DPP® HIV 1/2 -SSP tem 2 linhas coloridas na janela de teste, 1 azul (linha teste) e 1 verde (linha controle) (figura 2). Se uma ou as 2 linhas coloridas estiverem ausentes, não utilize o teste. Desconsidere o suporte de ensaio e guarde o mesmo para análise técnica do problema pelo controle de qualidade". Comunique o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos (Avenida Brasil, 4365 - Manguinhos. Cep: 21040-900 – RJ/RJ. Tel: (21) 3882-7101 – Fax: (21) 38827176 SAC: 08000.210.310 ou sac@bio.fiocruz.br). Utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

Poço 2 = TAMPÃO

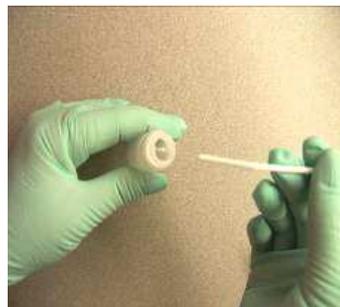
Janelas de Teste com Linhas Azuis e Verde

Poço 1 = AMOSTRA + TAMPÃO

Figura 2

- Antes de coletar a amostra de sangue, soro ou plasma, identificar o frasco para eluição com o nome do indivíduo ou número de identificação e desenrosque o dosador (parte branca) do frasco mantendo a tampa azul rosqueada no dosador.

- Encostar a alça coletora de 10 µL na amostra a ser testada permitindo que a alça seja preenchida com a amostra.
- OBS: Em caso de coleta de sangue da ponta do dedo, utilizar as lancetas (inclusas no kit), de acordo com as instruções de uso que as acompanham.

- Inserir a alça coletora de 10 µL com a amostra no frasco de eluição identificado de modo que toque no fundo do frasco. Dobre a haste da alça coletora no ponto de quebra a fim de que a extremidade com a amostra permaneça dentro do frasco de eluição.

▪ Recolocar o dosador no frasco de eluição certificando de que tanto o dosador quanto a tampa azul estão bem fechados e agite levemente por 10 segundos.

▪ Retirar somente a tampa azul do dosador e girar o frasco de eluição mantendo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço 1. Adicionar duas gotas da solução, lentamente, ao poço 1.

▪ Aguardar cinco minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.

▪Verter o frasco de tampão de corrida e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço 2. Adicionar quatro gotas de tampão, lentamente, ao poço 2.

▪Deixar o teste correr por 10 minutos após a adição do tampão ao poço 2 a temperatura entre 15 a 25℃. Caso não haja migraç ão após 3 minutos da adição do tampão no poço 2, descartar o teste.

ATENÇÃO

Não leia os resultados após 25 minutos contados a partir da adição do tampão de corrida ao poço 2.

ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico e perfuro-cortante.

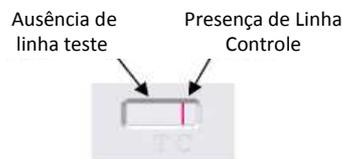
4. Leitura e interpretação dos resultados

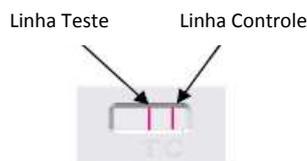
Os resultados podem ser interpretados visualmente

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e anotar no protocolo de trabalho.

4.1 Interpretação visual dos resultados

a. Resultado não reagente

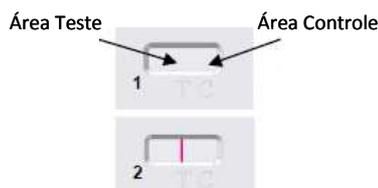
Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para HIV-1 e HIV-2 na amostra e não exclui a possibilidade de infecção pelo HIV. Recomenda-se proceder à coleta de uma nova amostra 30 dias após a coleta da primeira amostra, e repetir o conjunto de procedimentos sequenciados descritos no Fluxograma para Diagnostico Laboratorial da Infecção pelo HIV.

b. Resultado reagente

A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indicam um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para HIV-1 e/ou HIV-2 foram detectados.

ATENÇÃO

O resultado reagente deve ser utilizado para definição do diagnóstico da infecção pelo HIV de acordo com o fluxograma da portaria 151 de 14 de outubro de 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE.

c. Resultado inválido

Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE (C), o teste deve ser considerado inválido e este resultado não pode ser interpretado. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.

Limitações do procedimento:

Resultados falso-negativos podem ser obtidos caso o teste seja utilizado em amostras de pacientes conhecidamente soropositivos, que estejam em vigência ou tenham sido submetidos à terapia anti-retroviral**.**

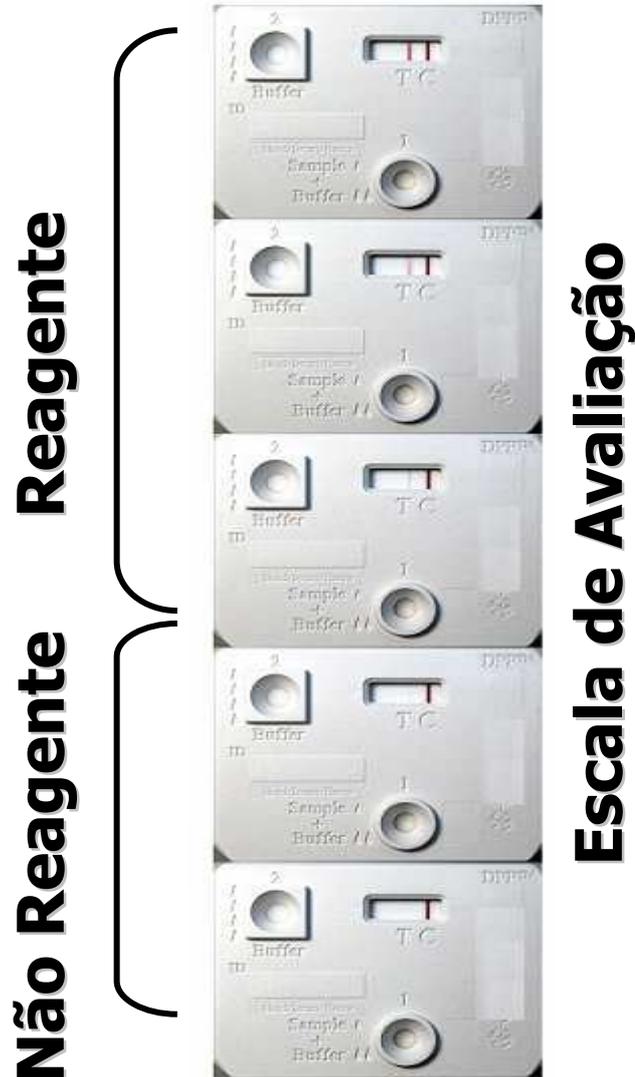
4.1 Utilização da escala visual para interpratação dos resultados

A finalidade deste procedimento é fornecer orientações para a leitura visual e avaliação dos resultados dos testes DPP, utilizando-se a escala de avaliação.

PROCEDIMENTO:

1.Antes de ler os resultados, certifique-se que a Escala de Avaliação esteja localizada próxima ao teste, para comparação;
2. Os resultados não reagentes serão lidos e registrados como negativo (Neg);

3. Os resultados positivos serão lidos e registrados como positivo (Pos) ou positivo fraco (Pf);

4. Os resultados devem ser registrados de forma adequada em cadernos ou formulários, de acordo com os procedimentos do laboratório.

5. Conservação e estocagem do material

O kit TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos – SSP deve ser armazenados entre 2 e 30ºC. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30ºC. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original.

IMPORTANTE

Não Congele o kit ou seus componentes!

6. Considerações finais

- O kit TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos- SSP deve ser utilizados segundo as instruções contidas neste manual e/ou manual que acompanha o kit, visando à obtenção de resultados adequados.

-Somente abra o envelope laminado contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.

- Não utilize kits ou componentes com a data de validade vencida.

- Um resultado reagente sugere a presença de anticorpos para HIV-1 e/ou HIV-2 na amostra testada, não diferenciando os tipos de vírus contidos na amostra.

- Inicialmente, pressupõe-se que um indivíduo que apresenta anticorpos para HIV-1 ou HIV-2 esteja infectado com HIV. Exceto no caso dos voluntários de estudos clínicos com vacinas anti-HIV, que podem ter desenvolvido anticorpos vacinais, estando ou não infectados com o vírus.

- Um resultado não-reagente não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por HIV, dado que uma resposta imunológica à exposição recente pode levar algumas semanas para atingir níveis detectáveis.

-Não é indicado o uso com amostras obtidas de crianças com idade inferior a 2 anos.

7. Referências bibliográficas

1. Centers for Disease Control and Prevention (1988) Universal precautions for revention of transmission of human immunodefi ciency virus, hepatitis B virus, and other loodborne pathogens in health-care settings. MMWR,37(24):377-388.

2. Essex, M. Human immunodefi ciency viruses in the developing world. Adv Virus Res, 53:71-88, 1999.

3. Kanki, P.J.; Hopper, J.R. and Essex, M. The origins of HIV-1and HTLV-4/HIV/2. Ann N Y Acad Sci, 511: 370-375, 1987.

4. Nicoll, A.; Gill, O.N. The global impact of HIV infection and disease. Commum Dis. Publ Health, 2: 85-95, 1999.

5. Valdiserri, R.O.; Holtgrave, D.R.; West, G.R. Promoting early diagnosis and entry into care. AIDS, 13: 2317-2330, 1999.

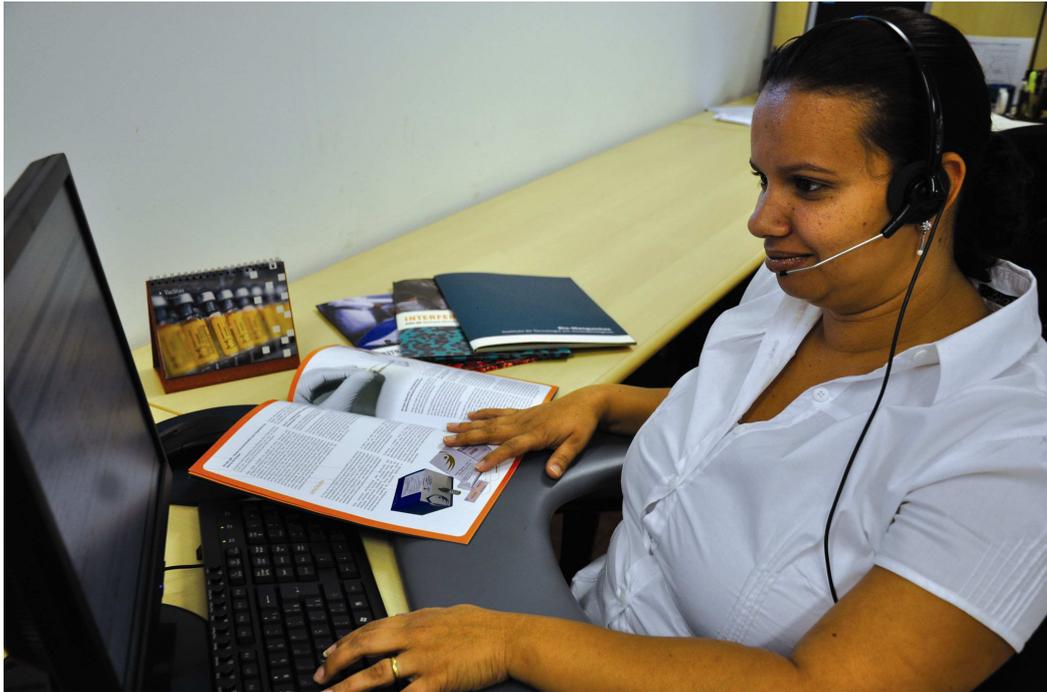
6.UNAIDS I WHO Press Release HIV Infection rates decreasing in several countries but globally number of people living with HIV continue to rise. Available at www.unaids.org/epi/2005/ doc/docs/PR EpiUpdateNovo 5en.pdf:1-3, 2005.

7. Centers for Disease Control and Prevention. Revised guidelines for HIV counseling, testing and referral and revised recommendations for HIV screening of pregnant women. MMMWR, 50(19): 32-35, 2001.

8. Essex,M.; Kanki, P.J.; Marlink, R., et al. Antigenic characterization of the human immunodefi ciency viruses. J AM Acad Dermatol, 22:1206-1210, 1990.

9.Manual de Instruções de Uso do Kit TR DPP® HIV-1/2 - Bio-Manguinhos – Fevereiro/2011

10.Portaria SVS/MS Nº 151, de 14 de outubro de 2009

8. Em caso de solicitações ou notificações

Entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos

(Avenida Brasil,4365 - Manguinhos. Cep: 21040-900 – RJ/RJ.
Tel: (21) 3882-7101 – Fax: (21) 3882-7176
SAC: 08000.210.310 ou sac@bio.fiocruz.br .